

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP200 4 / 0 0 0 4

EP04/488

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 02 520.0

Anmeldetag:

23. Januar 2003

Anmelder/Inhaber:

Supramol Parenteral Colloids GmbH,
61191 Rosbach/DE

Bezeichnung:

Kohlensäurediester von Stärkefraktionen und deren
Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und
Verwendung zur Kopplung an pharmazeutische
Wirkstoffe

IPC:

C 08 B, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

RECEIVED

Zusammenfassung

1. Kohlensäurediester von Stärkefraktionen und deren Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung zur Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe.
- 2.1 Bei der Kopplung von Stärkefraktionen und deren Derivaten wie z.B. Hydroxyethylstärke (HES) an pharmazeutische Wirkstoffe in wasserhaltigem Milieu treten Nachteile in Form von unerwünschten Nebenreaktionen auf. Es soll eine neue Methode zur Kopplung von Stärkefraktionen und deren Derivate an pharmazeutische Wirkstoffe in wasserhaltigem Milieu gefunden werden bei der diese Nachteile nicht auftreten.
- 2.2 Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass neue Kohlensäurediester von Stärkefraktionen und deren Derivate gefunden wurden, mit welchen eine Kopplung dieser Verbindungen an pharmazeutische Wirkstoffe im wässrigen Milieu ohne die beschriebenen Nachteile gelingt.
- 2.3 Verbesserte Kopplungsmethode von Stärkefraktionen und deren Derivate an pharmazeutische Wirkstoffe im wasserhaltigen Milieu.

Kohlensäuredlester von Stärkefraktionen und deren Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung zur Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe

Die Konjugation von pharmazeutischen Wirkstoffen insbesondere von Proteinen mit Polyethylenglycol-Derivaten ("PEGylierung") oder Polysacchariden wie Dextrane oder insbesondere Hydroxyethylstärke ("HESylierung") hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen mit der Zunahme an pharmazeutischen Proteinen aus der biotechnologischen Forschung.

Oft haben solche Proteine eine zu kurze biologische Halbwertszeit, welche durch Kopplung an die oben angeführten Polymeren-Verbindungen wie PEG oder HES gezielt verlängert werden kann. Durch die Kopplung können aber auch die antigenen Eigenschaften von Proteinen positiv beeinflusst werden. Im Falle von anderen pharmazeutischen Wirkstoffen kann durch die Kopplung die Wasserlöslichkeit erheblich vergrößert werden.

HES ist das hydroxethylierte Derivat des in Wachsmaisstärke zu über 95 % vorkommenden Glucosepolymers Amylopektin. Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, die in α -1,4-glykosidischen Bindungen vorliegen und α -1,6-glykosidische Verzweigungen aufweisen. HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zur Zeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8 (8, 1987) Seite 271 – 278 und Weidler et. al., Arzneimittelforschung / Drug Res., 41, (1991) Seite 494 – 498.

HES wird im wesentlichen über das gewichtsgemittelte mittlere Molekulargewicht M_w , das Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichts M_n , die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Die Substitution mit Hydroxyethylgruppen in Ätherbindung ist dabei an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 6 der Anhydroglucoseeinheiten möglich. Der Substitutionsgrad kann dabei als DS ("degree of substitution"), welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemoleküle aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS ("molar substitution") beschrieben werden, womit die mittlere Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.

In DE 196 28 705 und DE 101 29 369 werden Verfahren beschrieben, wie die Kopplung mit Hydroxyethylstärke in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) über das entsprechende Aldonsäurelacton der Hydroxyethylstärke durchgeführt werden kann mit freien Aminogruppen von Hämoglobin bzw. Amphotericin B.

Da in wasserfreien, aprotischen Lösungsmitteln gerade im Falle der Proteine oft nicht gearbeitet werden kann, entweder aus Löslichkeitsgründen aber auch Gründen der Denaturierung der Proteine, stehen auch Kopplungsverfahren mit HES im wasserhaltigen Milieu zur Verfügung. Z. B. gelingt die Kopplung der am reduzierenden Kettenende selektiv zur Aldonsäure oxidierten Hydroxyethylstärke durch Vermittlung von wasserlöslichem Carbodiimid EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) (PCT/EP 02/02928). Sehr oft jedoch ist der Einsatz von Carbodiimiden mit Nachteilen behaftet, da Carbodiimide sehr häufig inter- oder intramolekulare Vernetzungsreaktionen der Proteine verursachen als Nebenreaktionen.

Im Falle von phosphatgruppenhaltigen Verbindungen wie Nukleinsäuren gelingt die Kopplung oft gar nicht, da die Phosphatgruppen mit EDC ebenfalls reagieren können (S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC-Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 1993, Seite 199).

Es bestand daher die Aufgabe, solche aktivierten Derivate von Hydroxyethylstärke oder anderen Polysacchariden zu finden, die in rein wässrigen Systemen oder auch in Lösungsmittelgemischen mit Wasser die Kopplung an Proteine oder andere Wirkstoffe gezielt ermöglichen, ohne die oben beschriebenen Nachteile aufzuweisen.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass aus Hydroxyethylstärken sowie anderen Polysacchariden wie z. B. Wachsmaisstärke-Abbaufractionen in trockenen aprotischen, polaren Lösungsmitteln wie Dimethylacetamid (DMA) oder Dimethylformamid (DMF) mit den Carbonaten bestimmter Alkohole wie z. B. N-Hydroxy-Succinimide die entsprechenden Kohlensäurediester hergestellt werden konnten, die sich im wässrigen Milieu mit nukleophilen NH_2 -Gruppen von Wirkstoffen zu (stabileren) Urethanen

vorteilhafterweise umsetzen lassen. Als Nebenreaktion tritt eine Verseifung mit Wasser zum Polysaccharid, dem freien Alkohol und CO_2 auf.

Bei der Herstellung der Kohlensäurediester kann durch Wahl der molaren Verhältnisse der Substitutionsgrad mit reaktiven Kohlensäurestergruppen festgelegt werden, aus denen sich dann später auch der Substitutionsgrad mit den pharmazeutischen Wirkstoffen bei der Kopplung ergibt.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Kohlensäurediester erfolgt durch die Umsetzung der trockenen Stärkefraktionen bzw. ihrer Derivate in trockenen, aprotischen Lösungsmitteln wie z.B. Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylacetamid (DMA) und den entsprechenden Carbonaten der Alkoholkomponente.

Die erfindungsgemäßen Kohlensäurediester können aus der Lösung in DMF durch trockenes Ethanol, Isopropanol oder Aceton gefällt und durch mehrfaches wiederholen des Vorganges gereinigt werden. Solche Kohlensäurediester können dann in Substanz isoliert zur Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe verwendet werden. Die Lösung der Reaktionsprodukte in inertem apolarem Lösungsmittel kann jedoch auch direkt ohne Isolierung des aktiven Kohlensäurediesters zur Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe weiterverwendet werden.

Weitere geeignete Kohlensäurediester von Stärkefraktionen bzw. deren Derivate sind die Ester mit sulfoniertem N-Hydroxy-Succinimid oder auch geeigneten Phenolderivaten. Ebenfalls vorteilhaft kann der entsprechende Ester des N-Hydroxy-Benzotriazols eingesetzt werden.

Als Stärkederivate können geeignete Hydroxyethylstärke-Fraktionen eingesetzt werden aber auch andere Stärkederivate wie z. B. Hydroxypropylstärke. Ebenfalls kommen infrage die in der deutschen Patentanmeldung 102 17 994 beschriebenen hypervverzweigten Stärkefraktionen.

Beispiele

Beispiel 1

Herstellung von Hes 10/0,4 Kohlensäurediester des N-Hydroxy-Succinimids.

5 g getrocknete Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht $M_w = 10.000$ Dalton und einem Substitutionsgrad $MS = 0,4$ werden in 30 ml trockenem Dimethylformamid bei 40°C gelöst und nach Abkühlen der Lösung mit der äquimolaren Menge an NN'-Disuccinimidylcarbonat versetzt unter Feuchtigkeitsausschluß. Nach 2 Stunden rühren bei Raumtemperatur wird der gebildete Kohlensäurediester des N-Hydroxysuccinimids und HES direkt weiterverarbeitet wie im Beispiel 3 beschrieben.

Beispiel 2

Herstellung von Hes 10/0,4 – gekoppeltem Myoglobin

5 mg Myoglobin werden in 0,4 ml Bicarbonatpuffer 0,3 molar pH 8,4 gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,5 ml der Lösung aus Beispiel 2 mit dem enthaltenen HES 10/0,4 Kohlensäurediester des N-Hydroxysuccinimids über 2 Stunden portionsweise bei Raumtemperatur zugegeben. Der Ansatz wird 1 Stunde rühren gelassen. Die Bildung des hesylierten Myoglobins wird über Gel-Permeationschromatographie mit einer Ausbeute von $> 90\%$, bezogen auf das eingesetzte Myoglobin, bestimmt.

Patentansprüche

1. Kohlensäurediester von Stärkefraktionen oder Stärkefraktions-Derivaten.
2. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 1, wobei die Stärkefraktionen Abbaufractionen des Amylopektins sind.
3. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 2, wobei die Abbaufractionen des Amylopektins durch Säureabbau und/oder Abbau durch α -Amylase von Wachsmaisstärke gewonnen werden.
4. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 3, wobei die Stärkefraktionen ein mittleres Molekulargewicht M_w von 2.000 – 50.000 Dalton aufweisen und eine mittlere Verzweigung von 5 – 15 mol% α -1,6-glykosidischen Bindungen.
5. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 1, wobei die Stärkefraktions-Derivate Hydroxyethyl-Derivate von Abbaufractionen der Wachsmaisstärke sind.
6. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 5, wobei das mittlere Molekulargewicht M_w der Hydroxyethylstärke-Fractionen im Bereich von 2 – 300.000 Dalton liegt und der Substitutionsgrad MS zwischen 0,1 und 0,8 liegt sowie das C2/C6-Verhältnis der Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2 und C6 der Anhydroglucosen zwischen 2 und 15 liegt.
7. Kohlensäurediester gemäß Ansprüchen 1-6, wobei die Alkoholkomponente N-Hydroxy-Succinimid, Sulfo-N-Hydroxysuccinimid, substituierte Phenole oder Hydroxy-Benzotriazol ist.

8. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 1-6, wobei die Alkoholkomponente N-Hydroxy-Succinimid und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid ist
9. Verfahren zur Herstellung von Kohlensäurediester aus Stärkefraktionen und deren Derivate und einem zweiten, davon verschiedenen Alkohol dadurch gekennzeichnet, dass die getrockneten Polysaccharide bzw. ihre Derivate in wasserfreien, polaren, aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylacetamid (DMA) gelöst werden, gegebenenfalls unter Wärme, dem Ansatz je nach dem gewünschten Veresterungsgrad die entsprechenden molaren Mengen an Carbonat der 2. Alkoholkomponente zugesetzt werden und danach der Ansatz unter Wasserausschluß und Rühren 2 Stunden ausreagieren gelassen wird.
10. Verfahren zur Herstellung von Kohlensäurediester aus Stärkefraktionen und deren Derivate und N-Hydroxy-Succinimid und seine Derivate gemäß Anspruch 9 dadurch gekennzeichnet, dass die wasserfreien Stärkefraktionen und deren Derivate in wasserfreien, polaren, aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylacetamid (DMA) gelöst werden, gegebenenfalls unter Wärme, dem Ansatz je nach gewünschtem Kopplungsgrad erforderliche molare Mengen an NN'-Disuccinimidylcarbonat oder ein Derivat desselben zugegeben werden und dieser unter Rühren während 2 Stunden bei Raumtemperatur ausreagieren gelassen wird.
11. Verfahren zur Herstellung von mit Stärke oder Stärke-Derivaten an an freien Aminofunktionen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, dass Kohlensäurediester von Stärke bzw. Stärke-Derivaten damit umgesetzt werden unter Ausbildung von stabilen Urethanbindungen.

12. Verfahren nach Anspruch 11 dadurch gekennzeichnet, dass die Kohlensäurediester der Stärke oder deren Derivate Ester des N-Hydroxy-Succinimids, des Sulfo-N-Hydroxy-succinimids, der substituierten Phenole oder Hydroxy-Benzotriazole sind.
13. Verfahren nach Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, dass die Diester Ester von Hydroxy-Succinimid und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid sind.
14. Verfahren nach Ansprüchen 11, 12 und 13 dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktionen Abbaufractionen der Wachsmaisstärke sind und die Stärkederivate Hydroxyethylstärke.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.